

Immunomodulatory Roles of PE/PPE Proteins and Their Implications in Genomic Features of *Mycobacterium tuberculosis*

Soo Young Choi and Sung Jae Shin*

Department of Microbiology, Institute of Immunology and Immunological Diseases, Brain Korea 21 PLUS Project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Tuberculosis, caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), remains a notorious cause of human death worldwide. A deeper understanding of the proline-glutamate (PE) and proline-proline-glutamate (PPE) families, which comprise 10% of the coding regions in the Mtb genome, has uncovered their unique roles in host-pathogen interactions. Further, comparative genomic analysis of different Mtb strains has proposed that Mtb has acquired diverse gene sets that play immunomodulatory roles in host-pathogen interactions. This review delineates the various immunomodulatory roles of PE/PPE antigens and discusses their implications in the development of the improved diagnostic tools and vaccines.

Key Words: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Immunomodulation, PE/PPE protein

INTRODUCTION

결핵(Tuberculosis)은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)에 의해 감염되는 치명적인 감염병으로 전 세계 인구의 1/3이 결핵균에 감염되었다고 추정되며, 매초 1명의 비율로 새로운 감염환자가 발생된다. 매년 결핵을 앓는 사람들의 비율은 전 세계적으로 조금씩 줄고 있으나 새로운 환자 수는 여전히 줄어들지 않고 있다. 그러나 대부분 결핵균에 감염된 자들은 약 90%가 활동성 결핵이 나타나기까지 증상이 없는 잠복감염 상태를 보이며, 이 중 10%만이 평생 동안 결핵으로 진행될 가능성이 있다 (1). 그 동안 결핵 퇴치를 위한 제어기법의 연구로 BCG (Bacille Calmette-Guerin) 백신 외에 여러 가지 화학적 치료제를 개발하게 되었고 지금도 다양한 백신이 개발 중

에 있으나, 최근의 결핵환자들은 약제내성 균주에 의해 걸리는 비율이 높아지고 있기 때문에 치료의 효율을 향상시키기 위해서는 새로운 방법의 개발이 필요하다.

결핵의 치료에는 세균을 직접적으로 죽이기 위해 항생제를 사용하거나, 예방으로 BCG 백신을 접종한다. BCG 백신은 결핵의 첫 번째이자 유일한 백신으로, 여러 나라에서 어린이들을 대상으로 결핵균 노출 전, 방어 면역을 획득시키기 위해 사용되고 있으나 그 효과가 0%에서 80%로 다양하고 특히 성인의 폐결핵에는 그 효과가 제한적이어서 BCG 백신의 효능을 뛰어넘는 새로운 백신의 도입이 시급하다.

BCG 백신은 우형 결핵균에서 유래한 것으로, 1905년 이후에 Calmette와 Guérin이 프랑스의 Institute Pasteur de Lille 연구소에서 결핵성 유방염을 앓고 있는 소의 *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*)를 분리하여 13년간 계대 배양

Received: August 18, 2015/ Revised: August 20, 2015/ Accepted: August 26, 2015

*Corresponding author: Sung Jae Shin. Department of Microbiology and Institute of Immunology and Immunological Diseases, Yonsei University College of Medicine, 50-1 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 03722, Korea.

Phone: +82-2-2228-1813, Fax: +82-2-392-9310, e-mail: sjshin@yuhs.ac

**This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of science, ICT & Future Planning (NRF-2013R1A2A1A01009932).

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

하여 약독화 시켜 BCG를 제조하였고, 1921년에 처음으로 인체를 대상으로 백신의 효능평가를 시도하였다 (2). 이후에 여러 나라로 분양이 되었고 사회적 부작용도 일으키기도 하면서 각 나라의 배양방법 등에 따라 조금씩 성상이 달라져 여러 가지 BCG 균주들이 나타나게 되었다. 따라서 배양되어진 연구소와 지역적 차이로 백신 효과는 매우 다양하게 나타날 수 있으며, 결핵의 첫 번째 백신이자 현재까지도 유일하게 쓰이고 있는 것으로써 여전히 항결핵의 효과가 미비하고 성인의 폐결핵에는 효능이 제한적이기 때문에 이를 대체할 수 있는 새로운 개념의 치료기법 개발과 과학적 원리를 토대로 한 접근이 불가피하다고 할 수 있다. 따라서 본 종설에서는 지역과 병원성에 따라 결핵균들이 가지고 있는 독특한 유전학적 특성과 이를 구성하고 있는 항원들의 면역학적 특성을 파악하고 그 중요성을 서술하여, 항결핵 면역을 제공할 수 있는 결핵균 항원, 특히, PE/PPE family 항원들의 면역조절 역할(immunomodulatory action)에 대해 기술해 보고자 한다.

1. 결핵균의 유전적 특징

결핵균의 표준 균주로 알려진 *Mtb* H37Rv은 약 4,000개의 유전자와 4,411,519개의 염기 쌍으로 되어 있으며, 세균 중에서는 *Escherichia coli* 다음으로 큰 genome 크기이다. 염기의 G+C 비율도 65.6%로 매우 높은 편으로, 1998년 결핵균의 전체 genome의 배열 순서가 밝혀졌다 (3). 이 후, 본 연구를 바탕으로 결핵균에 대한 본질적인 이해와 병원성에 대한 연구가 급진적으로 가속화되었다 (4). 결핵균은 그람 양성 균으로 호기성이며 세포 표면에 두꺼운 지질 층의 외피(envelope)로 싸여 있으며, 주로 지방산 대사와 관련이 있는 250개의 많은 유전자를 포함하고 있어 지질 대사를 주요 에너지원의 대사로서 살아간다. 따라서 결핵균은 탄소 원으로 지질만을 이용하여 증식할 수 있으며 이 지질의 사용과 대사 경로와 관련된 유전자가 결핵균 감염의 여러 단계에서 중요한 역할을 한다고 알려졌다 (1). 이는 외부 막을 갖고 있는 병원체의 생존의 유전적 중요성과 지질 대사가 얼마나 큰 비중을 차지하고 있는지를 말해 주는 것이라고 볼 수 있으며, 이러한 결핵균의 세포벽을 이루고 있는 독특한 구조와 구성 때문에 수십 년간 이 분야의 연구가 집중적으로 수행되었다 (4, 5). 결핵균의 두꺼운 지질 층은 산성에 잘 견딜 수 있도록 하는 역할을 하고 동시에 약제의 침투까

지 막아 약제 저항성에도 영향을 주는 것으로 보고 있으며 (3~5), 이러한 세포벽 구조는 많은 단백질과 지질 성분을 포함하고 있는데 이 중 mycolic acid는 이런 세포벽을 이루는 가장 중요한 구성 성분으로 병의 발병과 병원성에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다 (6). 결핵균은 지방산(β -hydroxyl fatty acids)이 분지(branch)를 형성하면서 긴 사슬 구조의 형태를 형성하는데 mycolic acid는 이 구조를 이루는 중요한 지질 성분으로 이 mycolic acid의 합성이 저해될 때 지질분자에 변형이 발생하여 사슬 구조가 제대로 형성이 되지 않아 병원성이 떨어지게 된다 (3, 6). 이 외에도 결핵균의 외부 막 구조에는 비공유적으로 연결되어 있는 많은 다양하고 독특한 지질(lipid)과 당지질(glycolipid)을 포함하고 있으며 이 때문에 견고한 세포벽 구조가 형성되어 수분과 지질 성분 모두 통과하기 어려운 극도의 소수성(hydrophobicity) 상태의 외피 구조가 생산된다 (4). 이미 17년 전부터 결핵균의 유전자 서열과 구성물질이 밝혀졌음에도 불구하고 결핵균의 독특한 세포벽 구조를 형성하는 기작에 대한 연구는 현재까지 미궁으로 많이 남아 있으며, 결핵균 세포벽의 이 같은 특징에 집중하여 mycolic acid의 합성에 요구되는 Pks13 (polyketide synthase 13)의 메커니즘을 억제함으로써 세포벽 합성의 저해를 일으킬 수 있는 새로운 표적 약물(drug target)이 최근 제시되기도 하였다 (6). 이와 같이 결핵균의 외피 구조는 숙주 내에서 결핵균의 생존이 가능하게 하는 특징을 부여함과 동시에 질병을 일으키는 병원성과도 직결되는 것으로, 세포벽 구조에 관여되고 있는 많은 화합물들은 유력한 생물학적 활동성과 기능을 갖고 있는 것으로 나타나고 있다. 이 밖에 세포벽 구조에 포함되어 있는 성분으로 세포 내부 막을 이루는 주요 성분인 mycolic acid 외에 peptidoglycan, arabinogalactan, 그리고 외부 막에 연관되어 있는 것으로 lipoarabinomannan (LAM), lipomannan, phthiocerol dimycocerosate, dimycolyl trehalose, sulfolipids, phosphatidylinositol mannosides와 같은 것들이 있으며 (4), 이는 큰포식세포(macrophage)의 interferon- γ (IFN- γ) 억제와 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 유도, 육아종의 염증(granulomatous inflammation) 형성과 lymphocyte response 억제 등을 일으키는 것으로 알려졌다 (7, 8). 이와 같이 병원체로서 숙주 내에서 살아남는 결핵균의 특징을 세포벽 성분과 연관 지어 연구한다면 결핵의 병인기전과 병의 독성 요인에 대한 이해를 크게 증진시킬 수 있으며, 또 세포벽을 구성하는 각각의 유전자 산

Table 1. Basic features of PE/PPE family subgroup

N-terminal domain	PE family protein		PPE family protein	
	PE alone (~110 aa)	PPE (~180 aa) PPE-SVP	GXXSVPXXW	
C-terminal domain	PE	Unique C-terminal region	PPE	Unique C-terminal region
	PE-PGRS	(GGA or GGN) _n	PPE-MPTR	(NXGXGNXG) _n

물과 분비된 단백질을 표적으로 하는 새로운 치료기법을 개발한다면 결핵을 효율적으로 제어할 수 있는 방법으로 각광 받을 수 있을 것이다.

2. PE/PPE family protein

1) 유전적 특징

결핵균의 전체 genome의 배열 순서 완성으로, 병원성과 관련하여 언급할 만한 몇 가지 독특한 특징 중 하나로 PE/PPE family 단백질을 들 수가 있다 (3). PE/PPE family에 속하는 단백질들은 결핵균 유전자의 전체 코딩용량에서 약 10%를 차지하고 있으며, 산성의 glycine이 풍부한 단백질을 부호화하고 있는 두 무리의 유전자계이다. 이들은 N-terminal 부분에 일정하게 보존된 모티프로써 proline-glutamate (PE), 그리고 proline-proline-glutamate (PPE)의 반복되는 서열이 나타나고 있어 이를 PE/PPE라 명명하였다. PE/PPE의 기능과 그 특성은 아직도 명백히 밝혀진 것은 아니지만 그 동안의 연구에 의하면 이 항원들은 세포벽을 구성하거나 분비되는 형태의 단백질(secreted protein)로 결핵균의 병원성을 나타내는 데에 매우 중요한 요소로 알려져 있다 (9). 분비된 단백질은 박테리아의 병인기전에 특히 중요한 것으로써 결핵균에서도 이러한 단백질들은 병원성의 인자로서 매우 중요하며, 또한 이런 병원성을 나타내는 것은 각 단백질의 위치와 관계가 있는 것으로 보고 있다 (7, 9). PE/PPE는 N-terminal 부분에 각각 110개와 180개의 일정한 아미노산으로 보존되어 있는 domain을 가지고 있으며, 이어서 매우 다양한 크기와 반복 구조를 보이는 서열로 이루어져 있는 C-terminal을 가지고 있다 (3, 4, 9) (Table 1). 또한 PE family는 약 100개, PPE family는 약 69개의 단백질들로 구성되어 있으며, 이들은 다양한 C-terminal에 따라 두 아군으로 나눌 수 있다. PE family는 PE-PGRS (polymorphic GC-rich sequence), 그리고 PPE는 PPE-MPTR (major polymorphic tandem repeat)

을 각각 아군으로 가진다. PE-PGRS는 C-terminal에 G+C의 서열을 많이 가지고 있기 때문에 PGRS라고 부르며, Gly-Gly-Ala이나 혹은 Gly-Gly-Asn의 반복되는 서열을 가지고 있다. 한편 PPE-MPTR은 Asn-X-Gly-X-Gly-Asn-X-Gly의 반복되는 구조의 서열을 보이고 있는데 또 하나의 PPE family의 아군으로 350번째 아미노산 서열 근처에 'SVP'라는 모티프를 포함하고 있는 것도 있다 (10). 이들은 모두 G+C 비율이 높은 단백질을 코드화하고 있으며, 병원성이 높은 *Mycobacterium* 종에 특히 많이 들어 있고 약 200개의 *pe/ppe* gene들이 *Mtb*와 *M. bovis* 모두에 들어 있다 (3, 11). 여기에서 생성된 단백질들은 면역학적으로 영향을 미칠 수 있는 특성을 갖고 있으며 C-terminal 서열의 다양한 변화로 인해 다양한 항원을 제공하는 것으로 알려졌다 (4, 12, 13) (Table 1).

또한 어떤 PE/PPE family들은 면역학적 발병원(immunopathogenic antigen)으로 잘 알려진 ESAT-6를 포함하고 있는 *esx-1* gene cluster와 관계가 있는 것으로 알려졌다 (14). 결핵균은 그 독특한 세포벽으로 인하여 매우 소수성이며 동시에 물질을 통과시키기 어려운 성질이 있는데 이를 통하여 세포 외로 단백질을 수송하기 위해 사용되는 특별한 분비 체계가 있다. 이를 ESX Type VII secretion system이라고 하는데, 결핵균의 genome에는 이 운송 체계를 부호화 하고 있는 것으로 *esx-1*에서 *esx-5* cluster를 포함하고 있다. 이 중에서 특히 *esx-1*과 *esx-5*가 병원성과 관계되어 있다고 알려져 있다 (15, 16). ESX-1은 BCG에는 결여되어 있는 region of difference 1 (RD 1)이라는 유전적 장소(genomic locus)에 의해 부호화 되는 것이며, 유력한 T 세포의 항원으로 잘 알려진 ESAT-6나 CFP-10과 같은 단백질들이 여기에서 분비되는 것으로 알려져 있다. 또한 병원성과 관련된 ESX-1/RD1의 유전적 장소는 그 부분의 확대와 병원성의 확산을 위하여 mycobacterial 감염을 촉진시키는 것으로 나타났다 (12). 그리고 ESX-5 system에

서 면역조절 단백질, 즉 PPE와 PE를 구성하는 모든 단백질들이 분비되는 것으로 알려져 있으며 *esx-4*를 제외한 나머지에서 모두 하나 이상의 PE/PPE를 분비하고, 이 중 *esx-5*가 가장 많이 연루되어 있는 것으로 보고 있다. 그리고 ESX-1과 ESX-5 모두 발병을 일으킬 수 있는 mycobacterial 세포의 이동에 영향을 주는 것으로 보고 있다 (3, 16). 그러므로 *esx* region은 Type VII이나 ESX 분비 체계(secretion system)를 부호화 하는 region으로, *pe/ppe* gene 들은 처음 이 ESX system이 복제가 될 때 끼어 들어가 이 gene들이 확대될 때까지 함께 복제가 되어 생성된 것으로 보고 있다 (15). 따라서 그 동안 PE/PPE가 가지고 있는 서열의 상동성 조사나 3차원 구조를 기반으로 한 예측으로 PE/PPE의 기능의 일부가 밝혀졌는데, PE25와 PPE41 단백질의 복합체(complex)가 CFP-10과 ESAT-6 복합체와 매우 유사하다는 것이 확인되기도 하였다 (15). 이와 같이 *pe/ppe* gene과 *esx* gene cluster와의 진화론적 그리고 기능적인 연관으로, 이 단백질들은 병원성을 일으킬 수 있는 요인으로 매우 중요한 것들이라 할 수 있다.

2) PE/PPE 항원에 의한 선천 면역(innate immunity) 조절

결핵균에 대한 선천 면역(innate immunity)이나 후천 면역(adaptive immunity)은 모두 Toll-like receptors (TLRs)와 같은 pattern-recognition receptors (PRRs)에 의해 결핵균이 병원체로서 얼마나 잘 인식되느냐에 따라 달려 있다고 할 수 있다. TLR에 의한 microbial 리간드(ligand)는 inflammatory cytokine을 유발하며, 보조(adaptor) 단백질인 MyD88 (myeloid differentiation protein 88)과 결합하여 세포 내 신호 전달(signal transduction)을 일으켜 후천 면역을 일으킬 수 있는 cytokine이나 chemokine을 생산한다 (17). 결핵균은 TLR2/1/6, TLR9, TLR4에 의해 인식이 되며, TLR2를 통한 큰포식세포의 면역 활동은 결핵균 감염의 초기 방어에 중요한 역할을 한다고 보고 있다 (18). Mycobacterial 생산물에 의한 TLR의 활성화는 mycobacterial lipoprotein, lipomannan, lipoarabinomannan과 같은 것들의 반응을 조절하고, TNF- α 나 interleukin-12 (IL-12)와 같은 pro-inflammatory cytokine의 합성을 유도할 뿐만 아니라 일산화 질소(nitric oxide)의 생산도 유도한다 (19). Mycobacterial 세포벽에는 pro-inflammatory TLR2 리간드로 다양한 당지질(glycolipid)과 지질단백질(lipoprotein)들이 존재하며, PE/PPE 단백질도 여기에 포함되어 있어 TLR에 의한 신호로 cascade를 일으키거나 선천 면역 반응에 영향을 준다 (12).

다양한 선천 면역 리간드에는 TLR2의 신호 전달과 밀접한 연관이 있고, PE/PPE family 단백질의 선천 면역 조절 역할에 대해서는 Table 2에 요약하였다. 그러나 한편으로 TLR2의 신호는 식포 작용의 기능에 변이를 주는 데에도 연관되어 있어 결핵균의 리간드와 TLR2의 신호 전달이 연결되었을 때 큰포식세포의 MHC class II의 항원 제시를 억제하고 IFN- γ 에 대한 반응을 막는 것으로 확인되었다 (20). 이는 결핵균이 큰포식세포나 수지상세포(dendritic cell)의 항원제시 기능을 변화시키기 위해 TLR2의 신호를 강제로 확보하는 것으로, TLR2와 다양한 결핵균 구성물질들의 결합은 항원제시 기능과 pro-inflammatory 반응, 그리고 자가사멸(apoptosis)을 억제시켜 결핵균 감염에 대한 선천 면역(innate immune response)을 저해시킨다 (21).

또한 결핵균을 성공적으로 제거하려면 감염된 큰포식세포와 항원특이적(antigen-specific) T 세포와의 상호작용에 따라 달려 있다고 볼 수 있는데, 방어에 중요한 Th1 세포는 큰포식세포에 의한 IL-12 분비에 의해 지배적인 영향을 받고 반대로 IL-10은 Th1 세포의 기능을 억제시키고 결핵의 감염을 촉진한다 (22). 그리고 과도한 Th1 type의 면역 반응은 결핵의 제어에 도리어 방해가 될 수 있으나 반면 Th2 type의 반응은 조금만 일어나도 Th1의 면역 반응을 무너뜨리는데 충분할 수 있는 것으로 항결핵을 위한 방어적 면역은 큰포식세포가 생산하는 IL-12와 IL-10에 매우 의존적이라 할 수 있으며, PE/PPE 단백질도 이 IL-12와 IL-10의 생산을 조절하여 Th1과 Th2의 불균형에 영향을 주는 것으로 나타났다 (23). IL-10은 이런 Th1 면역 반응을 파괴시킬 뿐만 아니라 결핵의 방위에 방해가 되는 Th2 type의 면역 반응을 유도하는 것으로, 결핵의 감염의 모든 단계는 항상 IL-12와 IL-10의 균형이 깨지기 쉬운 Th2 type의 면역 반응으로 가는 상태라고 할 수 있다. 따라서 결핵은 이런 Th1과 Th2 균형의 변화로 인해 유발되는 질병 중 하나이기도 하다. 또한 결핵균은 감염 동안 유전자의 발현을 변화시켜 이 항원들이 면역 반응을 조절할 수 있도록 영향을 주고 있는 것으로 많은 PE/PPE 단백질들이 스트레스 상태나 큰포식세포의 감염 동안 발현 양이 많아져, 감염 중 박테리아의 생존이나 세포 내 생존율을 높이는데 주요한 역할을 하고 있는 것으로 보고 있다 (24). 따라서 PE/PPE 단백질들도 각각 다른 환경에서 나타나는 발현으로 다양한 메커니즘에 의하여 손상된 면역 반응을 나타내는 것으로 생각되고 있고, 그래서 Th2 type의 cytokine을 유발하는 것으로 보고 있다.

Table 2. Summary of PE/PPE protein functions in immune responses

	PE/PPE number	Rv number	Location	Features	Studied in	Evaluated as vaccine candidate	Reference
PE	PE3	Rv0159c		Cell survival during hypoxia-induced persistence		O	
	PE4	Rv0160c		Protective efficacy Improves the survival of mycobacteria in macrophages	Mø	O	26
	PE5	Rv0285		Modulate innate immunity and mediate bacillary survival	Mø		26
	PE6	Rv0335c	Cell wall	Insertion sequences and phages			
	PE7	Rv0916c	ESX5	Protective immunity			
	PE9	Rv1088		Protein pair, induced apoptosis through TLR4	Mø		
	PE10	Rv1089					
	PE11	Rv1169c		B cell response, lipase Up-regulated in TB bacilli, induced necrotic cell death	Mø		10
	PE15	Rv1386	ESX3	Modulate innate immunity and mediate bacillary survival	Mø		12
	PE17	Rv1646		Protective immunity			12
	PE18	Rv1788	ESX5	Strong immunogenicity, reduction of cell wall integrity		O	16
	PE19	Rv1791	ESX5	Strong immunogenicity, reduction of cell wall integrity		O	16
	PE20	Rv1806	ESX5	Reduce guinea pig bacterial lung burden		O	11
	PE25	Rv2431c	ESX5	Protein complex with PPE41, induce B cell response and T cell proliferation	Mø		23
	PE34	Rv3746c		Up-regulated in human lung granuloma			10
	PE35	Rv3872	RD1	Immunomodulatory role, increase IL-10, decrease IL-12/TNF- α , pair with PPE68	Mø	O	12
PPE	PPE2	Rv0256c		Inhibited nitric oxide	Mø		26
	PPE13	Rv0878c		Important for mycobacterial survival in macrophage	Mø		26
	PPE14	Rv0915c		Specific CD4 and CD8 T-cell response		O	
	PPE17	Rv1168c		Targets the Mtb cell wall, TLR2 binding protein			25
	PPE18	Rv1196		Anti-inflammatory cytokine induction	Mø	O	23
	PPE24	Rv1753c		Promote survival inside macrophage	Mø		26
	PPE25	Rv1787	ESX5	Influence macrophage vacuole acidification	Mø	O	16
	PPE26	Rv1789		T cell response, reduce bacterial lung		O	
	PPE27	Rv1790	ESX5	Strong immunogenicity, reduction of cell wall integrity		O	16

Table 2. Continued

PE/PPE number	Rv number	Location	Features	Studied in	Evaluated as vaccine candidate	Reference
PPE29	Rv1801		Intracellular survival of the bacilli Up-regulated by 8-fold in human brain microvascular endothelial-cell-associated Mtb			13
PPE31	Rv1807		Required for the growth of the bacterium <i>in vivo</i> during infection			12
PPE32	Rv1808		Manipulate the host cytokine	Mø		12
PPE34	Rv1917c		DC maturation	DC		23
PPE36	Rv2108	Cell wall	Potent T cell antigen			10
PPE37	Rv2123		Induce low tumor necrosis factor alpha			26
PPE38	Rv2352c	Cell wall	Modulates the innate immune response	Mø		26
PPE41	Rv2430c		Necrosis, B cell response	Mø		10, 12
PPE42	Rv2608		protective immunity		O	
PPE44	Rv2770c		Strong cellular and humoral immune responses		O	10
PPE46	Rv3018c		Strong T cell immunogenicity		O	
PPE47	Rv3021c		Up-regulated by 8-fold in human brain microvascular endothelial-cell-associated Mtb			13
PPE55	Rv3647c		Serological recognition			
PPE57	Rv3425	Cell wall	Drive Th1 immune response, Activation of macrophages in a TLR-2 dependent manner	Mø		
PPE60	Rv3478		Protective immunity, reduce bacterial lung			
PPE63	Rv3539	Membrane	Intermediary metabolism and respiration			12
PPE68	Rv3873	Cell wall	Potent T cell antigen, may act as an ESX-1 gating protein			10
PE-PGRS	PE-PGRS3	Rv0278c	Virulence, detoxification, adaptation			
	PE-PGRS10	Rv0747	Lipid metabolism			
	PE-PGRS11	Rv0754	DC maturation, survival of mycobacteria under oxidative stress	DC		12
	PE-PGRS17	Rv0978c	B cell response, up-regulated in TB bacilli			12
	PE-PGRS26	Rv1441c	Cause increased IL-10 and reduced IL-12	Mø		10
	PE-PGRS30	Rv1651c	Cell pole Required for the full virulence, essential for survival in macrophage	Mø		26

Table 2. Continued

	PE/PPE number	Rv number	Location	Features	Studied in	Evaluated as vaccine candidate	Reference
PE-PGRS	PE-PRGS33	Rv1818c	Cell wall	Influences bacterial cell structure, T cell immunogenicity Strong IFN- γ and protection again <i>M. tuberculosis</i> Directly interact with TLR-2, mediating apoptosis, necrosis.	M ϕ	O	10, 12
	PE-PRGS34	Rv1917c	Cell wall	Induce selective maturation of human DC activation	DC		
	PE-PRGS62	Rv3812		Strong T cell immunogenicity, reduce bacterial lung burden		O	10
	PE-PRGS63	Rv3097c		Lipase activity, LipY			10

이 중 PPE18 (Rv1196)은, 큰포식세포의 cytokine을 변화시키고 이 단백질을 DNA 백신으로 투여하였을 때 BCG 백신을 투여했을 때보다 더 많은 단백질 발현 양을 보이며, 또한 세포 표면에 노출되어 있는 단백질로 큰포식세포의 TLR2 수용체(receptor)와 작용하여 cytokine 분비를 조절함으로써 IL-10의 활성을 유도하는 것으로 알려졌다 (25). IL-10의 생산은 TLR2에 의한 p38 MAPK (mitogen activated protein kinase)의 활성화에 의존되는 것으로 알려져 있으며, PPE18 단백질이 p38 MAPK-SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3) -Rel 신호를 표적으로 하여 IL-12/TNF pro-inflammatory 반응을 하향 조절(down-regulation)하는 것으로 밝혀졌다 (25). TLR2를 통한 PPE18 단백질의 anti-inflammatory 효과는 TNF- α 와 같은 pro-inflammatory cytokine의 생산과는 다른 것으로 이는 TLR2의 다른 domain과 작용을 하는 것이며, 이 부분은 또한 ERK 1/2와 TNF- α 의 생산을 활성화 시키는 것으로 알려져 있는 lipopeptide Pam3CSK4와는 다른 작용기이기도 하다. 또한 PPE17에 의해 생산되는 NF- κ B를 매개로 한 pro-inflammatory 신호 전달도 다른 domain의 작용기에 의한 것으로 분류된다 (26). 따라서 TLR2는 결핵균의 다양한 리간드를 인식하고 다른 cytokine 신호 전달을 유도하는 것으로 여겨지고 있으나 그 기작에 대해서는 아직 명확하지 않다. 그러므로 TLR2의 하향 조절 신호 전달(downstream signaling)은 TLR-2의 특이적인 리간드에 따라서 pro-와 anti-inflammatory

모두 cascade할 수 있는 것으로 보고 있으며, 그 외 C-terminal에 MPTR domain을 갖고 있는 PPE-MPTR34도 TLR2를 통하여 숙주 세포의 반응을 변화시킬 수 있는 것으로 확인되었다 (12). 이 외에 PPE34, PPE35, PPE68 등도 모두 MAPK 신호 경로(signaling pathway)를 변화시켜 숙주의 cytokine을 조절하는 것으로 알려져 있다 (26). 한편 PE-PGRS 단백질은 Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBVNA)과 비슷한 특징이 있는 것으로, 이들은 모두 glycine이 풍부한 polypeptide family이고 Gly-Ala의 반복되는 서열을 가지고 있어 이 region은 ubiquitin/proteasome 항원 제시 경로(antigen-processing pathway)의 cis-acting 억제자(inhibitor)로 작용하여, MHC class I의 항원 처리 과정을 방해하고 억제하는 것으로 알려졌다 (3). 따라서 이와 같은 개념과 관련하여 PE-PGRS33이나 PE-PGRS17과 같은 단백질들이 항원 제시를 억제함으로써 면역 반응의 회피를 일으키는 것으로 확인되었고 (23), 또한 TLR2에 의존하여 큰포식세포에서 TNF- α 의 생산을 유도하고 숙주 세포의 자가사멸을 일으키는 작용 또한 하는 것으로 알려졌다 (17). PE-PGRS11과 PE-PGRS17도 TLR2와 작용하여 수지상 세포를 활성화하고 성숙시키는 것으로 알려졌다며, 이들은 모두 세포 표면에 노출되어 있고 세포 외로 분비되는 단백질들로 숙주의 표적과 직접적으로 작용하여 면역 반응에 영향을 끼치는 단백질들이므로 알려졌다 (10).

3) PE/PPE 항원에 대한 체액성 면역(humoral immunity)와 세포성 면역(cell-mediated immunity) 반응

CD4⁺T cell에 의한 세포성 면역는 효과적인 방어 면역 반응에 중요하며 결핵의 감염을 제어하는데 필수적이다 (12). CD4⁺T 세포의 반응을 기준으로 peptide 선별 검사(library screening)를 해 보았을 때 긍정적으로 판명된 항원 중 약 45%가 PE/PPE family 단백질에서 차지되며 (12), 면역학적으로 우세한 PE/PPE 단백질들은 그 family 구성원들 중에서 서로 보유하고 있는 항원 결정기(epitope)를 얼마나 많이 가지고 있는냐에 따라 우세할 가능성이 높은 것으로 알려졌다 (12). 이는 또한 peptide를 모두 모아 적용할 때, 아울러 N-terminal의 보존된 서열을 위주로 한 peptide일 때 다른 region을 대표하여 만든 것보다 더 반응이 좋은 것으로 나타났다 (13). 그리고 약 20 PE/PPE 단백질들이 이들의 재조합 단백질(recombinant protein)의 전체 길이에서, 혹은 각각의 peptide 모두에서 CD4와 CD8의 반응을 이끌어낸다는 것이 관찰되기도 하였다 (10). 또한 체액성 면역는 결핵의 감염을 제어하는데 별로 중요한 것 같지 않았으나 세포성 면역에 수반되는 체액성 면역는 결핵의 감염을 제어하는데 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다 (27). Mtb 특이적 항체는 결핵균의 유포와 조직의 해로운 염증 반응을 조절하는데 영향을 끼치며, 육아종 형성에 있어서도 중요한 성분이 된다 (10). 또한 PE/PPE는 잠정적으로 B 세포 항원 결정기가 많고 대부분의 단백질들이 세포 표면에 노출되어 있으므로 체액성 반응에 표적이 잘 될 것으로 보고 있다. 따라서 많은 PE/PPE 단백질들이 B 세포 반응을 일으키는 것으로 관찰되었으며 PE-PGRS와 PPE-MPTR family에서처럼 빈번하게 반복되는 구조의 domain이 항체의 반응을 올리는 데 주요한 이유가 되는 것으로 보고 있다 (10). 이와 같은 바탕에서 PE-PGRS33 단백질은, 일정한 서열이 보존되어 있는 N-terminal 부분과 다양하고 빈번한 반복구조를 보이는 C-terminal 부분으로 나누어 T 세포와 B 세포의 반응을 살펴본 경우, 단백질의 전체 서열에서보다 나누는 것이 더 반응이 좋다는 것이 확인되기도 하였다 (28).

이와 같이 병원성과 함께 면역 조절 역할과 관련하여 다양한 PE/PPE 단백질들 중에서 각각의 역할에 따라 면역 반응에 영향을 주고 항결핵의 효과로 입증되었던 PE/PPE 항원에 대한 주요 연구들은 표 2에 요약하였다(Table 2).

CONCLUSION

그 동안 결핵의 치료를 위하여 여러 가지 화학적 치료와 BCG 백신의 접종으로 질병의 상황이 잠시 호전되는 듯 보였으나, 해마다 사망하는 환자와 신환자의 비율이 다시 증가하고 있는 추세이다. 더군다나 최근 결핵 제어의 문제점은 약제 내성 결핵균에 의한 발병이 높아지고 있기 때문에 사회적으로 그 심각성을 간과할 수 없다. 또한 그 동안 BCG 백신 사용 이후 면역 증강을 위한 새로운 신호의 경로나 BCG 백신을 대체, 또는 그 효과를 보강할 수 있는 결핵균의 subunit 백신의 후보물질 탐색으로, 여러 가지 새로운 약물의 개발과 새로운 백신으로 시도하려는 노력이 있었으나 (29, 30) 아직까지 BCG 백신의 효능을 뛰어넘는 새로운 백신의 개발은 미비한 상황이다. 이는 다시 말하면 그 동안의 노력에도 불구하고 아직까지도 결핵균 또는 결핵을 제어하기 위한 우리의 지식이 충분하지 못하다는 것을 의미한다. 따라서 결핵균에 대해 더 구체적인 이해가 필요하며 이를 바탕으로 하는 새로운 접근의 치료법이나 백신 개발이 이루어져야 한다. 결핵균의 세포벽을 구성하고 있는 항원들은 그 조합과 결핵 균주에 따라 숙주의 면역 조절 능력이 다르며 병원성과도 직접적 연관성이 있다. 그 중에서도 PE/PPE family 항원들은 그 중요성에 비하여 현재까지 연구가 미미한 상태이다. 따라서 PE/PPE family 항원들은 그 종류에 따라 발현 양과 독특한 구조, 감염시기, 감염된 세포의 종류와 결합하는 수용체가 다르며 이를 통하여 숙주의 면역을 조절하는 동시에 치료 표적과 백신 항원으로서의 가치 또한 높다. 따라서 이들이 조절하는 숙주의 다양한 신호 전달 경로와 이를 조절할 수 있는 물질들의 개발과 동시에 결핵균의 세포 내 생존과 관계된 병원성과 병인기전을 이해하는 것이 필요하다. 이를 통하여 결핵을 효율적으로 제어할 수 있는 새로운 치료기법, 진단기법, 백신 개발이 가능할 것으로 기대된다.

REFERENCES

- 1) Wiperman MF, Sampson NS, Thomas ST. Pathogen roid rage: Cholesterol utilization by *Mycobacterium tuberculosis*. Crit Rev Biochem Mol Biol 2014;49:269-93.
- 2) Bonah C. The 'experimental stable' of the BCG vaccine: safety,

- efficacy, proof, and standards, 1921-1933. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci* 2005;36:696-721.
- 3) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-44.
 - 4) Glickman MS, Jacobs WR Jr. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell* 2001; 104:477-85.
 - 5) Daff  M, Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol* 1998;39: 131-203.
 - 6) Wilson R, Kumar P, Parashar V, Vilch ze C, Veyron-Churlet R, Freundlich JS, *et al.* Anti-tuberculosis thiophenes define a requirement for Pks13 in mycolic acid biosynthesis. *Nat Chem Biol* 2013;9:499-506.
 - 7) Sibley LD, Adams LB, Krahenbuhl JL. Inhibition of interferon-gamma-mediated activation in mouse macrophages treated with lipoarabinomannan. *Clin Exp Immunol* 1990;80:141-8.
 - 8) Chatterjee D, Roberts AD, Lowell K, Brennan PJ, Orme IM. Structural basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor. *Infect Immun* 1992;60:1249-53.
 - 9) McEvoy CR, Cloete R, M ller B, Sch r ch AC, van Helden PD, Gagneux S, *et al.* Comparative Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* *pe* and *ppe* genes reveals high sequence variation and an apparent absence of selective constraints. *PLoS One* 2012;7:e30593.
 - 10) Sampson SL. Mycobacterial PE/PPE Proteins at the Host-Pathogen Interface. *Clin Dev Immunol* 2010;2011:497203.
 - 11) Vordermeier HM, Hewinson RG, Wilkinson RJ, Wilkinson KA, Gideon HP, Young DB, *et al.* Conserved immune recognition hierarchy of mycobacterial PE/PPE proteins during infection in natural hosts. *PLoS One* 2012;7:e40890.
 - 12) Nair S. Immunomodulatory Role of Mycobacterial PE/PPE Family of Proteins. *Proc Indian Natn Sci Acad* 2014;80:1055-72.
 - 13) Chaitra MG, Hariharaputran S, Chandra NR, Shaila MS, Nayak R. Defining putative T cell epitopes from PE and PPE families of proteins of *Mycobacterium tuberculosis* with vaccine potential. *Vaccine* 2005;23:1265-72.
 - 14) Gey van Pittius NC, Sampson SL, Lee H, Kim Y, van Helden PD, Warren RM. Evolution and expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (*esx*) gene cluster region. *BMC Evol Biol* 2006;6:95.
 - 15) Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PA, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CM, *et al.* Type VII secretion - mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:883-91.
 - 16) Sayes F, Sun L, Di Luca M, Simeone R, Degaiffier N, Fiette L, *et al.* Strong immunogenicity and cross-reactivity of *Mycobacterium tuberculosis* ESX-5 type VII secretion: encoded PE-PPE proteins predicts vaccine potential. *Cell Host Microb* 2012;11:352-63.
 - 17) Quesniaux V, Fremond C, Jacobs M, Parida S, Nicolle D, Yermeev V, *et al.* Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect* 2004;6:946-59.
 - 18) Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 2005;202:1715-24.
 - 19) Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, *et al.* Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999; 285:732-6.
 - 20) Gehring AJ, Dobos KM, Belisle JT, Harding CV, Boom WH. *Mycobacterium tuberculosis* LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol* 2004;173:2660-8.
 - 21) Fortune SM, Solache A, Jaeger A, Hill PJ, Belisle JT, Bloom BR, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage responses to IFN-gamma through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 2004; 172:6272-80.
 - 22) Higgins DM, Sanchez-Campillo J, Rosas-Taraco AG, Lee EJ, Orme IM, Gonzalez-Juarrero M. Lack of IL-10 alters inflammatory and immune responses during pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis* 2009;89:149-57.
 - 23) Mukhopadhyay S, Balaji KN. The PE and PPE proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2011;91:441-7.
 - 24) Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol* 2002;43:717-31.
 - 25) Nair S, Pandey AD, Mukhopadhyay S. The PPE18 protein of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits NF-kappaB/rel-mediated proinflammatory cytokine production by upregulating and phosphorylating suppressor of cytokine signaling 3 protein. *J*

- Immunol 2011;186:5413-24.
- 26) Ahmed A, Das A, Mukhopadhyay S. Immunoregulatory functions and expression patterns of PE/PPE family members: Roles in pathogenicity and impact on anti-tuberculosis vaccine and drug design. IUBMB Life 2015;67:414-27.
- 27) Maglione PJ, Xu J, Chan J. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol 2007; 178:7222-34.
- 28) Delogu G, Brennan MJ. Comparative immune response to PE and PE_PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 2001;69:5606-11.
- 29) Jang B, Shin SJ. Peptidylarginine Deiminase and Citrullination: Potential Therapeutic Targets for Inflammatory Diseases. J Bacteriol Virol 2013;43:159-67.
- 30) Cha SB, Shin SJ. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) and BCG-based vaccines against Tuberculosis. J Bacteriol Virol 2014;44:236-43.
-